

Ochratoxin A risk assessment in Portuguese wines: a one-year case study

L. ABRUNHOSA, R. SERRA, N. LIMA, A. VENÂNCIO*

Centro de Engenharia Biológica-IBQF, Universidade do Minho, Campus de Gualtar,
4710-057 Braga, Portugal.
avenan@deb.uminho.pt

KEY WORDS: Portuguese wines, ochratoxin A, contamination, *Aspergillus*, *Penicillium*.

ABSTRACT

During the 2001 wine vintage, grapes were sampled at harvest time in eleven vineyards located in four Portuguese wine regions (from north to south: Vinhos Verdes, Douro, Ribatejo and Alentejo) for filamentous fungi isolation and identification, and for ochratoxin A (OTA) analysis. In all studied vineyards, fungi isolates belonging to *Penicillium* and *Aspergillus* recognized as producers of OTA were tested to detect its production. Also, several strains were assessed for their ability to degrade OTA in other compounds. The *Penicillium* isolates were not OTA producers, although some were able to degrade OTA. Many of the *Aspergillus* strains belong to the black *Aspergillus* section, mainly: *A. niger* aggregate and *A. carbonarius*. Not all the strains from the above-mentioned *Aspergillus* were able to produce OTA, but most of them were able to degrade OTA. It was found that just 13 out of 207 *A. niger* aggregate and 32 out of 33 *A. carbonarius* were OTA producers. Furthermore, all the black *Aspergillus* tested were able to degrade OTA, in many cases to the less toxic ochratoxin α . It was also observed a prevalence of not OTA producer strains over the producer ones, and many of these not OTA producer strains were able to degrade OTA. The presence of OTA in grapes from all sampled vineyards was determined. However, it was not possible to correlate the presence of OTA in grapes with the presence of OTA producer strains in the same grapes. The possibility that the presence of OTA in grapes is due to in vivo interactions between the ability to produce and to degrade the mycotoxin by fungi is suggested. (Bulletin O.I.V., 2003, vol. 76, n° 869-870, pp. 618-634).

Evaluation des risques de contamination des vins portugais par l'Ochratoxine A : étude menée sur un an

L. ABRUNHOSA, R. SERRA, N. LIMA, A. VENÂNCIO*

Centro de Engenharia Biológica-IBQF, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal

*avenan@deb.uminho.pt

MOTS CLÉS : Vins portugais, ochratoxine A, contamination, *Aspergillus*, *Penicillium*.

RÉSUMÉ

En 2001, au moment des vendanges, nous avons cueilli des raisins dans onze vignes situées dans quatre régions viticoles du Portugal (du nord au sud : Vinhos Verdes, Douro, Ribatejo et Alentejo) pour isoler et identifier les moisissures filamenteuses et pour analyser la présence d'ochratoxine A (OTA). Pour toutes les vignes étudiées, les espèces de *Penicillium* et *Aspergillus* connues comme productrices d'OTA ont été testées quant à la production de cette mycotoxine. Nous avons aussi testé quelques moisissures pour savoir si elles étaient capables de transformer l'OTA et de produire des composés moins toxiques. La plupart des *Aspergillus* isolés appartiennent au groupe *Aspergillus* noir comme : *A. niger* (agrégat) et *A. carbonarius*. Cependant, nous avons trouvé que seulement 13 des 207 appartenant à l'agrégat *A. niger* et 32 des 33 *A. carbonarius* étaient producteurs d'OTA. Nous avons aussi constaté, dans la plupart des cas, que les *Aspergillus* noirs ont été capables de transformer l'OTA en ochratoxine α (OTA α). Nous avons pourtant trouvé dans les raisins une prédominance des moisissures non productrices d'OTA et des moisissures capables de transformer l'OTA. La présence de l'OTA dans les raisins de toutes les vignes échantillonnées a également été déterminée. Toutefois, il n'a pas été possible de relier la présence d'OTA dans les raisins avec la présence des espèces productrices de cette mycotoxine dans ces mêmes raisins. Les espèces capables de transformer l'OTA peuvent-elles, *in vivo*, jouer un rôle important ? (*Bulletin O.I.V.*, 2003, vol. 76, n° 869-870, pp. 619-634).

INTRODUCTION

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin with nephrotoxic, nephrocarcinogenic, teratogenic, and immunosuppressive properties, which has received a growing interest from the scientific community and food committees in the last years. It has been detected in different kinds of commodities, including grape juice and wine. It is generally accepted that the presence of OTA in wines is related with the type and the origin of wine. Red wines from the Mediterranean zone have been described as the ones with higher OTA contamination levels (Zimmerli and Dick, 1996; Ottener and Majerus, 2000; Dubernet, 2002).

The only known species capable of producing OTA belong to *Aspergillus* and *Penicillium*. These fungi are common saprophytes, and may be present in the vineyards. Therefore, in the process of winemaking, the possibility of OTA contamination starts in the field. Some species of black *Aspergillus* were described as capable of producing OTA, namely *A. niger* aggregate and *A. carbonarius* (Abarca et al, 1994; Téren et al, 1996). These species are present in the vineyards and have the ability to cause rot in the berries, known as *Aspergillus* rot. Among the species of this group, *A. carbonarius* shows the highest ochratoxigenic potential, with most of the isolates having the ability to produce OTA in synthetic media (Heenan et al., 1998). Recently, it has been pointed out that *A. carbonarius* might be the responsible for OTA production in grapes (Pitt, 2000).

Several physical, chemical or microbiological methods have been proposed for the removal of mycotoxins from foods and feeds, but few of these have practical application. In the particular case of wines detoxification methods have been tried too, being the mycotoxin removal by adsorption with fining agents the more studied one (Dumeau and Trioné, 2000; Castellari et al., 2001). However these studies showed that most of the fining agents have little effect on the removal of OTA. Active charcoal was the most effective one, but only at relatively high dosages. In consequence of this approach the quality of wines is severely damaged. In contrast, microbiological methods could be a good alternative. It is known that the same fungi responsible for the production of OTA in food commodities are also able to degrade it enzymatically in less toxic compounds (Varga et al., 2000; Abrunhosa et al., 2002). The enzymatic detoxification of foods is by far more convenient than the chemical or physical detoxification since it is substrate specific (Liu et al, 2001).

The Portuguese climate is dominated by Atlantic and Mediterranean influences. Thirty two wine making regions are defined, spread through the country, that possess distinct climatic conditions, which determine the grape varieties cultivated and influence the wine quality and properties. Therefore, Portugal offers good conditions to study the influence of the climate in the mycoflora of grapes and to investigate the main ochratoxigenic species present in grapes.

INTRODUCTION

L'ochratoxine A (OTA) est une mycotoxine dont les propriétés néphrotoxiques, néphrocarcinogènes, tératogènes et immunosuppressives sont connues et suscitent un intérêt grandissant dans la communauté scientifique et les comités d'alimentation depuis quelques années. Elle est fréquemment détectée dans différents types de denrées alimentaires, dont le jus de raisin et le vin. Il est admis généralement que la présence d'OTA dans le vin est liée au type et à l'origine du vin. Les vins rouges du pourtour méditerranéen ont été décrits comme ceux ayant les niveaux de contamination en OTA les plus importants (Zimmerli et Dick, 1996 ; Otteneder et Majerus, 2000 ; Dubernet, 2002).

Les seules espèces connues capables de produire de l'OTA appartiennent aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*. Ces champignons filamenteux sont des saprophytes communs et peuvent être présents dans les vignes. Par conséquent, dans le processus de vinification, le risque de contamination commence sur le terrain. Quelques espèces d'*Aspergillus* noir sont décrites comme étant capables de produire de l'OTA, notamment l'agrégat *A. niger* et *A. carbonarius* (Abarca *et al.*, 1994 ; Téren *et al.*, 1996). Ces espèces sont présentes dans les vignes et ont la capacité de produire dans les baies une pourriture appelée pourriture d'*Aspergillus*. Parmi les espèces de ce groupe, *A. carbonarius* présente le potentiel ochratoxigénique le plus élevé. La plupart des isolats ont, en effet, la capacité de produire de l'OTA en milieu synthétique (Heenan *et al.*, 1998). Récemment, il a été montré que *A. carbonarius* pourrait être responsable de la production d'OTA dans les raisins (Pitt, 2000).

Plusieurs méthodes physiques, chimiques ou microbiologiques ont été proposées pour supprimer les mycotoxines des denrées alimentaires mais très peu d'entre elles ont une application pratique. Dans le cas particulier du vin, des méthodes de détoxification ont également été expérimentées, la méthode de l'extraction de mycotoxine par adsorption à l'aide d'agents de collage étant la plus étudiée (Dumeau and Trioné, 2000 ; Castellari *et al.*, 2001). Cependant, ces études ont montré que la plupart des agents de collage avaient peu d'effet sur l'extraction de l'OTA. Le charbon activé a été le plus efficace mais uniquement à des dosages relativement élevés. Il résulte de cette approche une dégradation sévère de la qualité des vins. Par contraste, les méthodes microbiologiques pourraient être une bonne alternative. Il est reconnu que les moisissures responsables de la production d'OTA dans les denrées alimentaires sont également capables de la dégrader enzymatiquement en composés moins toxiques (Varga *et al.*, 2000 ; Abrunhosa *et al.*, 2002). La détoxification enzymatique des aliments est bien plus indiquée que la détoxification chimique ou physique car elle est spécifique au substrat (Liu *et al.*, 2001).

Le climat portugais est dominé par des influences atlantiques et méditerranéennes. Trente deux régions vinicoles sont définies à travers le pays et elles possèdent des conditions climatiques distinctes qui déterminent les variétés de raisin cultivées et influencent la qualité et les propriétés du vin. Le Portugal offre donc de bonnes conditions pour étudier l'influence du climat sur la mycoflore des raisins et les principales espèces qui produisent de l'ochratoxine présente dans le raisin.

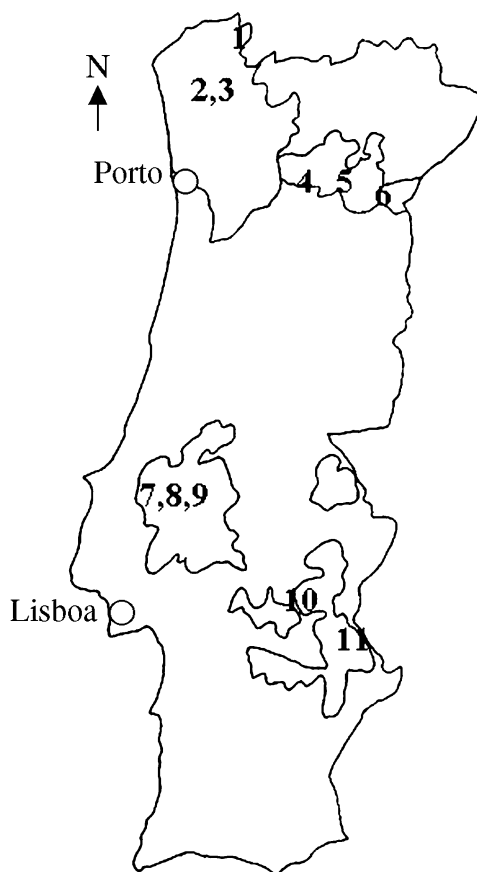
MATERIAL AND METHODS

Study area

Eleven vineyards in four winemaking regions were chosen for this study, based on their climatic differences and national economical importance, and are distributed as indicated in figure 1.

FIGURE 1

Location of the 11 vineyards in Portugal motherland: 1 to 3 in Vinhos Verdes Region; 4 to 6 in Douro Region; 7 to 9 in Ribatejo Region; 10 and 11 in Alentejo Region



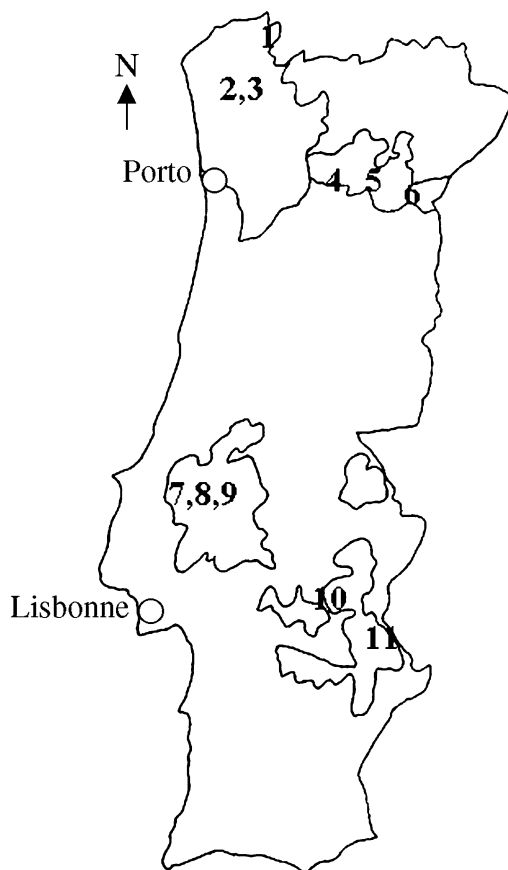
MATÉRIEL ET MÉTHODES

Zone d'étude

Pour cette étude, onze vignes de quatre régions vinicoles ont été choisies en fonction de leurs différences climatiques et de leur importance économique au niveau national. Elles sont réparties comme indiqué sur la *figure 1*.

FIGURE 1

Localisation des 11 vignobles au Portugal : 1 à 3 dans la région des Vinhos Verdes ; 4 à 6 dans la région du Douro ; 7 à 9 dans la région du Ribatejo ; 10 et 11 dans la région de l'Alentejo



Grape sampling and fungi isolation

The grapes were sampled at harvest time. In each vineyard, 10 bunches were collected along two crossing diagonal transects. The samples were transported to the lab in closed paper bags, and analysed in less than 24 hours after sampling.

From each bunch, 5 berries were randomly selected, cut in half and aseptically plated in DRBC medium (Oxoid); therefore, a total of 50 berries were sampled per vineyard. The plates were incubated for 7 days at 25 °C in the dark. From the second day of incubation, the plates were observed under the stereomicroscope for the presence of *Aspergillus* and *Penicillium* strains. The *Aspergillus* and *Penicillium* present in each grape were isolated to CYA-Difco and MEA (Blakeslee formula), respectively. The identification of isolates was achieved through microscopic observation after grown on MEA and Czapek Agar, for *Penicillium*, and on Czapek Agar, for *Aspergillus*.

Evaluation of the ochratoxigenic potential and the degradation ability

All the *Aspergillus* strains isolated were tested according to the method of Bragulat et al. (2001), to assess the potential for the production of OTA.

Some of the strains that were not found to produce OTA were tested for their ability to degrade OTA using the follow method: strains were inoculated in 5 ml YES medium supplemented with 1 µg/ml OTA; samples of the medium were collected before the inoculation and after 6 days incubation at 25 °C in the dark for the quantification of OTA (Abrunhosa et al., 2002).

Determination of OTA content in grapes

Berries were randomly selected from all bunches, to form an aggregate sample of ca. 200 g. The grapes were squashed, and the grape juice obtained was centrifuged at 4000 rpm during 30 min. The supernatant was then filtered through a 0.45 µm membrane (Gelman). From this filtrate, 50 ml were analysed according the method described by Visconti and co-workers (1999).

OTA detection by HPLC

The samples were analysed using a reverse phase HPLC equipped with a Jasco FP-920 fluorescence detector (330 nm excitation wavelength; 460 nm emission wavelength). Chromatographic separations were performed on a Waters Spherisorb ODS2 (4.6 mm x 250 mm; 5 µm) column, fitted with a precolumn with the same stationary phase. The mobile phase used was pumped at 1.0 ml/min and consisted of an isocratic programme as follows: acetonitrile:water:acetic acid (99:99:2, v/v/v). The injection volume was 100 µl. The OTA standard was supplied by Sigma (England). Samples were

Echantillonnage du raisin et isolement des moisissures

Les raisins ont été échantillonnés au moment des vendanges. Dans chaque vigne, 10 grappes de raisins ont été récoltées le long de deux transepts se croisant en diagonale. Les échantillons ont été transportés au laboratoire dans des sacs en papier et analysés en moins de 24 heures après l'échantillonnage.

Sur chaque grappe, 5 baies ont été prélevées au hasard, coupées en deux et lamées aseptiquement en milieu DRBC (Oxoid), un total de 50 baies a donc été prélevé par vigne. Les lames ont été placées en incubation pendant 7 jours à 25 °C dans l'obscurité. Dès le second jour d'incubation, les plaques ont été observées au microscope stéréoscopique afin d'y déceler la présence de souches d'*Aspergillus* et de *Penicillium*. Les souches d'*Aspergillus* et de *Penicillium* présentes dans chaque raisin ont respectivement été isolées dans CYA-Difco (formule Blaskesle) et MEA. L'identification des isolats a été réussie par observation au microscope après croissance en MEA et Czapek Agar, pour le *Penicillium* et en Czapek Agar, pour l'*Aspergillus*.

Evaluation du potentiel de production d'ochratoxine A et de la capacité de dégradation

Toutes les souches d'*Aspergillus* isolées ont été testées par la méthode de Bragulat *et al.* (2001) pour évaluer leur potentiel de production d'OTA.

On a testé la capacité à dégrader l'OTA des souches qui n'en ont pas produit à l'aide de la méthode suivante : des souches ont été inoculées dans 5 ml de milieu YES auquel on a ajouté 1 µg/ml d'OTA, des échantillons de milieu ont été collectés avant l'inoculation et après 6 jours d'incubation à 25°C dans l'obscurité pour la quantification d'OTA (Abrunhosa *et al.*, 2002).

Détermination de la teneur en OTA des raisins

Les baies ont été choisies au hasard parmi toutes les grappes pour former un agrégat d'environ 200 g. Les grappes ont été écrasées et le jus de raisin obtenu a été centrifugé à 4000 rpm pendant 30 min. Le surnageant a ensuite été filtré à travers une membrane de 0,45 µm (Gelman). 50 ml de ce produit filtré ont été analysés selon la méthode décrite par Visconti et ses co-auteurs (1999).

Détection d'OTA par CLHP

Les échantillons ont été analysés par CLHP à phase de polarité inverse équipé d'un détecteur de fluorescence Jasco FP-920 (longueur d'onde d'excitation 330 nm ; longueur d'onde d'émission 460 nm). Les séparations chromatographiques ont été effectuées sur une colonne Waters Spherisorb ODS2 (4,6 mm x 250 mm ; 5 µm), protégée d'une précolonne à la même phase stationnaire. La phase mobile utilisée a été pompée à 1,0 ml/min avec un programme isocratique comme suit : acétonitrile : eau : acide acétique (99 : 99 : 2, v/v/v). Le volume d'injection était de 100 µl. Le standard OTA

assumed positive for OTA presence if they yielded a peak at a retention time similar to the standard (approximately 12 min), with a height five times higher than the baseline noise.

RESULTS AND DISCUSSION

Number of *Penicillium* and *Aspergillus* strains observed at harvest time

The isolation of filamentous fungi from grapes took place during grape maturation. However, in order to look for a correlation between the presence of ochratoxigenic strains in grapes and their content in OTA, only the data on fungi at harvest time will be discussed.

At harvest time, *Penicillium* were observed in 184 berries from a total sample of 550 berries and *Aspergillus* strains were observed in 257 of these berries. These strains were not equally distributed between all four wine regions (Table I). The number of berries with *Aspergillus* strains in the Vinhos Verdes Region is much lower than in any of the other regions. The climatic conditions, which are not as dry and hot as in the other three regions, could explain this result.

All observed strains belonging to the two genera were identified to the species level. None of the *Penicillium* species identified were previously described as OTA producer. In contrast, some of the *Aspergillus* strains identified were recognized as ochratoxigenic species, namely *Aspergillus niger* aggregate and *A. carbonarius*. As in other studies (Sage et al, 2002) and in our previous surveys made in 1999 and 2000 (Abrunhosa et al., 2001; Serra et al., 2001), the known OTA producer – *A. ochraceus* – either was not found or found in a small number of berries.

Table I
Number of berries with *Penicillium* and *Aspergillus* strains at harvest time
in the four wine regions

Wine Region	Number of berries with <i>Penicillium</i>	Number of berries with <i>Aspergillus</i>	Number of sampled berries
Vinhos Verdes	35	9	150
Douro	85	93	150
Ribatejo	36	68	150
Alentejo	28	87	100
Total	184	257	550

a été fourni par Sigma (Royaume-Uni). On a admis la présence d'OTA dans les échantillons s'ils atteignaient un pic au temps de rétention identique au standard (approximativement 12 min) d'une taille 5 fois supérieure au bruit de référence.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Nombre de souches de *Penicillium* et d'*Aspergillus* observées lors des vendanges

L'isolement des champignons filamenteux des raisins s'est déroulé pendant la maturation du raisin. Cependant, afin de trouver une corrélation entre la présence de souches pouvant produire de l'ochratoxine dans les raisins et leur teneur en OTA, seules les données concernant les champignons au moment des vendanges seront discutées.

Au moment des vendanges, les souches de *Penicillium* ont été observées sur 184 baies sur un échantillon total de 550 baies et les souches d'*Aspergillus* ont été observées sur 257 de ces baies. Ces souches n'étaient pas équitablement distribuées dans les quatre régions vinicoles (Tableau I). Le nombre de baies contenant des souches d'*Aspergillus* dans la région de Vinhos Verdes est bien plus faible que dans les autres régions. Le climat qui n'est ni aussi sec ni aussi chaud que dans les trois autres régions pourrait expliquer ces résultats.

Toutes les souches observées appartenant aux deux genres ont été identifiées au niveau des espèces. Aucune des espèces de *Penicillium* identifiée n'a été précédemment décrite comme produisant de l'OTA. Par contraste, certaines des souches d'*Aspergillus* identifiées ont été reconnues comme étant des espèces pouvant produire de l'ochratoxine, notamment l'agrégat *Aspergillus niger* et *A. carbonarius*. Comme dans les précédentes études effectuées par Sage *et al.* en 2002 ainsi que par nous-mêmes en 1999 et 2000 (Abrunhosa *et al.*, 2001, Serra *et al.*, 2001), *A. ochraceus*, producteur connu d'OTA n'a été trouvé que dans un petit nombre de baies.

Tableau I

Nombre de baies contenant des souches de *Penicillium* et d'*Aspergillus* au moment des vendanges dans quatre régions vinicoles

Région vinicole	Nombre de baies contenant <i>Penicillium</i>	Nombre de baies contenant <i>Aspergillus</i>	Nombre de baies examinées
Vinhos Verdes	35	9	150
Douro	85	93	150
Ribatejo	36	68	150
Alentejo	28	87	100
Total	184	257	550

Table II

Number of black Aspergillus biseriata strains isolated from grapes and number of OTA producer strains

Species	Number of isolated strains	Number of tested strains	Number of OTA producing strains (percentage of total)
<i>A. niger</i> aggregate	202	202	13 (6.4 %)
<i>A. carbonarius</i>	33	33	32 (97 %)
Total	235	235	45 (19 %)

Among all *Aspergillus* strains isolated from these grapes, the black *Aspergillus biseriata* strains were the predominant ones. As expected most *A. carbonarius* and only few *A. niger* aggregate strains were OTA producers (Table II). It is known that not all the isolates belonging to the species mentioned are able to produce OTA (Téren et al., 1994; Serra et al., 2001).

Detoxifying properties of *Aspergillus* strains

It was previously reported that atoxigenic filamentous fungi are able to transform mycotoxins into less toxic compounds (Varga et al., 2000; Liu et al., 2001). As it can be observed from table II, less than 20% of our black *Aspergillus* isolates were able to produce OTA in vitro, and what about the other 80%?

A fraction of these black *Aspergillus* strains, together with other fungi also isolated from grapes, were screened for their capability to degrade OTA into other compounds, such as ochratoxin α , that is less toxic than OTA (Table III).

From tables II and III, it is clearly observed that the number of strains with the potential to degrade OTA is higher than the number of strains able to produce OTA. This observation should be considered when assessing the risk of OTA contamination in wines.

Ochratoxin A in grapes at harvest time

The content of ochratoxin A in sampled grapes was also determined. From each vineyard one sample of grape juice was obtained. Only in two grape juice samples (one in Vinhos Verdes and the other in Douro) it was found OTA, but in a concentration lower than 0.01 $\mu\text{g/l}$.

Tableau II

Nombre de souches d'*Aspergillus* bisérié isolées à partir de raisins et nombre de souches produisant de l'OTA

Espèce	Nombre de souches isolées	Nombre de souches testées	Nombres de souches produisant de l'OTA (pourcentage du total)
Agrégat <i>niger</i>	202	202	13 (6.4 %)
<i>A. carbonarius</i>	33	33	32 (97 %)
Total	235	235	45 (19 %)

Parmi les souches d'*Aspergillus* isolées de ces raisins, les souches d'*Aspergillus* noir bisérié étaient les souches dominantes. Comme nous nous y attendions, la plupart des souches *A. carbonarius* et seulement quelques souches de l'agrégat *A. niger* produisent de l'OTA (tableau II). Il est connu que quelques isolats appartenant aux espèces mentionnées ne sont pas capables de produire de l'OTA (Téren *et al.*, 1994 ; Serra *et al.*, 2001).

Propriétés de détoxification des souches d'*Aspergillus*

Les travaux de Varga *et al.*, 2000 et Liu *et al.*, 2001 ont montré que les champignons filamenteux atoxigéniques peuvent transformer les mycotoxines en composés moins toxiques. Comme on peut le voir dans le tableau II, moins de 20% de nos isolats d'*Aspergillus* noir peuvent produire de l'OTA *in vitro* mais qu'en est-il des 80% restant ?

Une fraction de ces souches d'*Aspergillus* noir, ainsi que d'autres moisissures également isolées à partir des raisins a été étudiée pour vérifier sa capacité à dégrader l'OTA en d'autres composés comme l'ochratoxine α qui est moins toxique que l'OTA (tableau III).

On peut clairement voir dans les tableaux II et III que le nombre de souches pouvant dégrader l'OTA est supérieur au nombre de souches capables de produire de l'OTA. Cette observation doit être prise en considération lorsqu'on évalue le risque de contamination par OTA des vins.

Ochratoxine A dans les raisins au moment des vendanges

La teneur en ochratoxine A des raisins observés a également été déterminée. Nous avons obtenu un échantillon de jus de raisin à partir de chaque vignoble. Ce n'est que dans deux d'entre eux (un dans la région des Vinhos Verdes et l'autre dans la région du Douro) que nous avons trouvé de l'OTA mais en concentration inférieure à 0,01 $\mu\text{g/l}$.

Table III

Number of non ochratoxigenic *Aspergillus* strains found in grapes, number of tested strains and number of OTA degrading strains

Fungi	Number of strains	Number of tested strains	Number of strains that transform in 6 days	
			60% < OTA degradation < 90%	≥ 90% OTA degradation
Black Aspergillus				
<i>A. niger</i> aggregate	189	22	2	20
<i>A. carbonarius</i>	1	1	–	1
Other Aspergillus				
<i>A. ochraceus</i>	0	1	–	1
<i>A. flavus</i>	7	3	0	0
<i>A. fumigatus</i>	1	5	4	1
<i>A. terreus</i>	1	3	2	0
<i>A. ustus</i>	1	3	0	0
<i>A. versicolor</i>	0	3	–	3
<i>A. wentii</i>	0	4	1	2
Other genera				
<i>Alternaria</i> sp.	123	1	1	–
<i>Botrytis</i> sp.	202	1	1	–
<i>Cladosporium</i> sp.	182	1	–	1

CONCLUSIONS

The risk assessment for the presence of ochratoxin A in wines from these four Portuguese wine regions was initiated with this work. The Portuguese climate is dominated by Atlantic and Mediterranean influences. From the four studied regions, the Vinhos Verdes region has the climate less influenced by the Mediterranean climate. This could explain the lower number of OTA producing strains that were found in grapes taken from this region. The other three regions are dryer and warmer, which may favour the development of black *Aspergillus*, including some OTA producing strains. Based on these results, it could be expected that wine producing regions of Portugal with Mediterranean climate influence, from the OTA producing filamentous fungi point of view, are more problematic than the other one. However, the data collected on the presence of OTA in grapes suggest that more complex factors may be involved.

When comparing data between tables II and III, it is concluded that the number of strains able to transform OTA is higher than the number of strains

Tableau III

Nombre de souches d'*Aspergillus* non productrices d'ochratoxine trouvées dans les raisins, nombre de souches testées et nombre de souches dégradant l'OTA

Champignon	Nombre de souches	Nombre de souches testées	Nombre de souches qui se transforment en 6 jours	
			60% < dégradation d'OTA < 90%	≥ 90% dégradation d'OTA
<i>Aspergillus noir</i>				
Agrégat <i>A. niger</i>	189	22	2	20
<i>A. carbonarius</i>	1	1	–	1
Autres <i>Aspergillus</i>				
<i>A. ochraceus</i>	0	1	–	1
<i>A. flavus</i>	7	3	0	0
<i>A. fumigatus</i>	1	5	4	1
<i>A. terreus</i>	1	3	2	0
<i>A. ustus</i>	1	3	0	0
<i>A. versicolor</i>	0	3	–	3
<i>A. wentii</i>	0	4	1	2
Autre genre				
<i>Alternaria</i> sp.	123	1	1	–
<i>Botrytis</i> sp.	202	1	1	–
<i>Cladosporium</i> sp.	182	1	–	1

CONCLUSIONS

L'évaluation du risque de présence d'ochratoxine A dans les vins de ces quatre régions vinicoles portugaises a été initiée dans cette étude. Le climat portugais est dominé par des influences atlantiques et méditerranéennes. De ces quatre régions étudiées, la région des Vinhos Verdes bénéficie du climat le moins influencé par le climat méditerranéen. Cela pourrait expliquer le faible nombre de souches produisant de l'OTA trouvé dans les raisins provenant de cette région. Les trois autres régions sont plus sèches et plus chaudes, ce qui pourrait favoriser le développement d'*Aspergillus* noir y compris celui qui produit de l'OTA. A partir de ces résultats, nous pouvons supposer que les régions vinicoles du Portugal sous l'influence du climat méditerranéen, en ce qui concerne les champignons filamenteux produisant de l'OTA peuvent être, plus problématiques que les autres. Cependant, les données collectées en présence d'OTA dans les raisins suggèrent que des facteurs plus complexes pourraient être impliqués.

Lorsqu'on compare les données des *tableaux II et III*, on peut conclure que le nombre de souches capables de transformer l'OTA est supérieur à celui

that produce OTA. This must be taken in account to explain the fact that vineyards with higher number of black Aspergillus strains do not have OTA.

It is possible that the presence of OTA in grapes is dependent on a balance that is established in the field between 'ochratoxin A producers' and 'ochratoxin A degraders' strains. This should be considered when assessing the risk of OTA contamination in wines and also when trying to correlate the presence of ochratoxin A producing strains with OTA levels in grapes.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the support of the EC, Quality of Life Programme (QoL), Key Action 1 (KA1) on Food, Nutrition and Health; contract number QLK1-CT-2001-01761 - Wine-Ochra Risk. R. Serra was supported by grant SFRH/BD/1436/2000 from Fundação para a Ciência e Tecnologia.

* *

*

des souches qui peuvent en produire. Cela doit être pris en compte pour expliquer le fait que les vignes ayant un nombre plus important de souches d'*Aspergillus noir* ne sont pas contaminées par l'OTA.

Il est possible que la présence d'OTA dans les raisins dépende d'un équilibre qui est établi sur le terrain entre les souches qui produisent de l'ochratoxine A et celles qui la dégradent. Cela doit être pris en compte lorsqu'on évalue le risque de contamination des vins et également lorsqu'on essaye de corrélér la présence de souches productrices d'ochratoxine A avec les niveaux d'OTA dans les raisins.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient chaleureusement le EC, Quality of Life Programme (QoL), Key action 1 (KA1) on Food, Nutrition and Health, numéro de contrat QLK1-CT-2001-01761- Wine Ochra Risk. R. Serra bénéficiait de la bourse SFRH/BD/1436/2000 de la Fundação para a Ciência e Tecnologia.

* *

*

BIBLIOGRAPHIE

- ABARCA (M.L.), BRAGULAT (M.R.), CASTELLÁ (G.), CABAÑES (F.J.), 1994. – Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**, 2650-2652.
- ABRUNHOSA (L.), PATERSON (R.R.M.), KOZAKIEWICZ (Z.), LIMA (N.), VENÂNCIO (A.), 2001. – Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. *Letters in Applied Microbiology*, **32**, 240-242.
- ABRUNHOSA (L.), SERRA (R.), VENÂNCIO (A.), 2002. – Biodegradation of Ochratoxin A by fungi isolated from grapes. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, **50**, 7493-7496.
- BRAGULAT (M.R.), ABARCA (M.L.), CABAÑES (F.J.), 2001. – An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *International Journal of Food Microbiology*, **71**, 139-144.
- CASTELLARI (M.), VERSARI (A.), FABIANI (A.), PARPINELLO (G.P.), GALASSI (S.), 2001. – Removal of ochratoxin A in red wines by means of adsorption treatments with commercial fining agents. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, **49**, 3917-3921.
- DUBERNET (M.), 2002. – Note de synthèse sur l'Ochratoxine A dans les vins. OIV FV n° 1161, 4 p.
- DUMEAU (F.), TRIONÉ (D.), 2000. – Influence de différents traitements sur la concentration en ochratoxine A des vins rouges. *Revue Française d'Œnologie*, **95**, 37-38.
- HEENAN (C.N.), SHAW (K.J.), PITT (J.I.), 1998. – Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar. *Journal of Food Mycology*, **1**, 67-72.
- LIU (D.-L.), YAO (D.S.), LIANG (Y.-Q.), ZHOU (T.-H.), SONG (Y.-P.), ZHAO (L.), MA (L.), 2001. – Production, purification and characterization of an intracellular aflatoxin-detoxifying enzyme from *Armillaria tabescens* (E-20). *Food and Chemical Toxicology*, **39**, 461-466.
- OTTENEDER (H.), MAJERUS (P.), 2000. – Occurrence of ochratoxin A (OTA) in wines: influence of the type of wine and its geographical origin. *Food Additives and Contaminants*, **17**, 793-798.
- PITT (J.I.), 2000. – Toxicogenic fungi: which are important?. *Medical Mycology*, **38**, 17-22.
- SAGE (L.), KRIVOBOK (S.), DELBOS (E.), SEIGLE-MURANDI (F.), CREPPY (E.E.), 2002. – Fungal flora and ochratoxin A production in grapes and musts from France. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, **50**, 1306-1311.
- SERRA (R.), KOZAKIEWICZ (Z.), LIMA (N.), VENÂNCIO (A.), 2001. – Isolation of filamentous fungi from grapes and study of ochratoxin A production in grape and must by indigenous *Aspergillus*. Book of abstracts of the conference *Bioactive Fungal metabolites – Impact and Exploitation*, Swansea, p 93.
- TÉREN (J.), VARGA (J.), HAMARI (Z.), RINYU (E.), KEVEI (F.), 1996. – Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia*, **134**, 171-176.
- VARGA (J.), RIGÓ (K.), TÉREN (J.), 2000. – Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. *International Journal of Food Microbiology*, **59**, 1-7.
- VISCONTI (A.), PASCALE (M.), CENTONZE (G.), 1999. – Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **864**, 89-101.
- ZIMMERLI (B.), DICK (R.), 1996. – Ochratoxin A in table wine and grape juice: occurrence and risk assessment. *Food Additives and Contaminants*, **13**, 655-668.